

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 657 352

(21) N° d'enregistrement national :

90 00870

(51) Int Cl⁵ : C 08 H 1/00; A 61 F 2/10//A 61 L 15/32

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.01.90.

(71) Demandeur(s) : ETAT FRANCAIS représenté par le
délégué général pour l'armement — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Gervaise Michel.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 26.07.91 Bulletin 91/30.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(74) Mandataire : Bureau des Brevets et Inventions
Délégation Générale pour l'Armement (DPAG).

(54) Nouveau produit biologique de remplacement du tissu conjonctif, à structure composite à base de collagène, et procédé pour sa préparation.

(57) L'invention concerne un produit à structure composite
à base de collagène.

Le produit comprend une trame spongieuse à larges
mailles de collagène soluble ou insoluble faiblement réticu-
lé, dans lesquelles est inclus du collagène natif fortement
réticulé. Il est obtenu par incorporation du collagène natif
dans la structure spongieuse, puis réticulation à l'intérieur
de ladite structure.

Application au remplacement du tissu conjonctif.

FR 2 657 352 - A1



5 L'invention concerne de nouveaux produits biologiques destinés au remplacement du tissu conjonctif, ainsi qu'un procédé de fabrication de ces produits biologiques par réticulation de collagène natif dans des structures spongieuses à base de collagène soluble ou insoluble de faible réticulation.

10 Il est souvent nécessaire de pouvoir disposer de produits de remplacement du tissu conjonctif, par exemple pour certaines opérations chirurgicales ou pour le traitement de brûlures importantes.

15 10 Le traitement des grands brûlés fait appel aujourd'hui aux biotechnologies, car l'utilisation d'allogreffes ou d'autogreffes n'est pas satisfaisante. En effet, les allogreffes d'un tissu conjonctif provenant d'un donneur génétiquement différent du receveur sont généralement rejetées, tandis que les autogreffes ne sont possibles que dans une certaine limite de surface lésée. De plus, les techniques d'autogreffes sont longues et complexes. Ainsi, la réanimation des grands brûlés imposant de les recouvrir le plus tôt possible, il est indispensable d'utiliser des pansements biologiques ou des équivalents de peau.

20 15 Les équivalents dermiques à utiliser doivent être stériles, hémostatiques lors de la greffe, cicatrisants, peu phlogogènes et biocompatibles. Ils doivent aussi constituer une barrière contre les pertes hydroélectrolytiques, protéiques et caloriques, présenter une bonne adhérence à la surface de la zone à greffer, et posséder de bonnes qualités plastiques pour s'y adapter. En outre, leur conservation et leur utilisation doivent être faciles, et ils doivent pouvoir être épidermisés *in vitro*. Or les produits biologiques de remplacement actuellement disponibles ne peuvent être correctement épithérialisés en surface.

25 30 35 Les produits biologiques de remplacement du tissu conjonctif actuellement disponibles sont essentiellement à base de collagène, et peuvent se ranger en deux catégories aux propriétés complémentaires:

1. Ceux à base de collagène soluble natif réticulé de type I.

2. Ceux formés d'éponges à base de collagène soluble ou insoluble associé à des glycosaminoglycans ou mucopolysaccharides (polysaccharides contenant de l'hexosamine d'origine animale) ou à d'autres molécules analogues.

5 Les divers types de collagène sont bien connus dans la technique et sont décrits notamment par E. Hay "Cell Biology of Extracellular Matrix" (1982) Plenum Press, New-York, et R.E. Burgeson "Genetic Heterogeneity of Collagens" J. Invest. Dermatol. 79, 25S-30S (1982). Le collagène de type I est essentiellement celui du derme et du chorion des muqueuses.

10 On sait l'importance du collagène comme biomatériau, notamment dans le traitement des pertes de substance cutanée, en chirurgie plastique ou osseuse parodontale, et dans divers autres domaines cliniques. On peut se référer en particulier à
15 B. Rouveix, 1er Congrès Atlantique - L'Avenir du collagène (Lyon 1985). En effet, les collagènes sont les principaux constituants de la trame protéique des tissus conjonctifs. Ils sont utilisés dans beaucoup de produits biologiques de remplacement tels que les pansements biologiques ou les équivalents
20 de peau réalisés *in vitro* pour la couverture des grands brûlés.

25 Les gels obtenus à partir du premier type de collagène subissent une réticulation spontanée à pH 7, à une température voisine de 37°C. Il en résulte un haut degré de réticulation du gel, ce qui permet une épithérialisation des équivalents conjonctifs qui peuvent alors servir de support pour la culture de cellules épithéliales, par exemple de cellules épidermiques, ou pour la régénération épithéliale *in vivo*. Le diamètre des pores permettant la culture de cellules épithéliales doit être d'environ 100 nm, ce qui est obtenu par la réticulation des gels. En outre, les gels peuvent se rétracter sous l'action de cellules conjonctives telles que fibroblastes et chondrocytes, ce qui augmente la réticulation et améliore les qualités mécaniques. La fine réticulation de la trame des gels favorise la colonisation *in vitro* et *in vivo* par des cellules conjonctives et inflammatoires ainsi que par des vaisseaux

sanguins. Ces gels sont en outre hémostatiques lors des greffes.

Toutefois, leurs qualités mécaniques restent médiocres et ils se dégradent rapidement, comme indiqué par Bell et al. 5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 76, n°3, pp.1274-1278 (1979). Leur utilisation dans des greffes n'est donc pas satisfaisante.

Les gels de la deuxième catégorie indiquée ci-dessus ont 10 une structure à base d'éponges ayant un faible degré de réticulation, et présentant des pores de grande dimension. Cette caractéristique interdit pratiquement la culture de cellules à leur surface et l'inclusion de cellules conjonctives. Cette structure ne favorise pas la migration cellulaire. En outre, les glycosaminoglycans confèrent à ces gels des propriétés 15 anticoagulantes qui ne sont pas souhaitables lors d'une greffe après excision, tandis que le collagène soluble est hémostatique.

Le brevet FR 2.517.315 décrit un procédé de fabrication 20 de compositions associant un collagène natif ou déréticulé et des mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) se présentant sous forme de solutions limpides, de gels homogènes, de poudres ou d'éponges. La déréticulation est effectuée par 25 traitement par la soude à pH 14, qui a pour effet d'empêcher la réticulation importante des gels de collagène qui se produit à pH neutre. Pour pouvoir obtenir un gel homogène, selon ce brevet, il faut ramener le pH à 7 environ par addition de soude, puis effectuer une lyophilisation pour procurer des 30 structures spongieuses. Le traitement alcalin présente cependant l'inconvénient de créer une charge négative importante qui défavorise la culture cellulaire, et diminue la capacité du collagène à former des fibrilles *in vitro*, et à se réticuler.

Le brevet FR 2.516.927 décrit un procédé permettant 35 d'obtenir des composés sous forme de pâtes, membranes ou éponges, par extraction de collagène placentaire en grande partie insoluble, en opérant par traitement enzymatique et alcalin ; mais les collagènes obtenus ne peuvent pas réticuler

spontanément *in vitro*, et ne peuvent servir qu'à la préparation d'éponges, fibres, membranes ou fibres à usage chirurgical. Ces éponges ne peuvent être utilisées comme équivalents dermiques pour des greffes, mais seulement comme matériau de comblement, notamment osseux, par exemple en association avec l'hydroxyapatite comme dans le brevet FR 2.585.576.

Le brevet FR 2.318.189 décrit des matériaux composites collagène - mucopolysaccharides réticulés biocompatibles, la réticulation étant effectuée soit par fixation par le glutaraldéhyde, soit par réticulation déhydrothermique. La présence d'un mucopolysaccharide interdit en effet la réticulation spontanée *in vitro* du collagène, par blocage des télopeptides du collagène qui coprécipite dans le milieu de formation, ce qui ne permet pas de disposer de gel homogène.

Enfin, on connaît quelques procédés permettant d'obtenir, par culture *in vitro*, des épithéliums humains que l'on peut ensuite greffer au receveur en limitant les risques de rejet. Ainsi, le brevet FR 2.589.165 décrit une culture de cellules épithéliales, suivie d'une étape de congélation / décongélation des cellules en suspension; on peut ultérieurement effectuer une allogreffe des feuillets épithéliaux ainsi obtenus, mais ce procédé ne concerne que le remplacement de l'épiderme, et n'est pas satisfaisant dans le cas des brûlures profondes affectant tout le derme.

La présente invention a pour objet de nouveaux produits biologiques évitant les inconvénients des produits connus rappelés ci-dessus, présentant des propriétés favorisant la culture de cellules épithéliales en surface, et la greffe pour le remplacement du tissu conjonctif.

L'invention concerne également un procédé de préparation de tels produits à partir de collagènes ayant des propriétés spécifiques.

Les nouveaux produits biologiques selon l'invention se distinguent en ce qu'ils comprennent une structure composite à base de collagène soluble ou insoluble faiblement réticulé formant une trame spongieuse à larges mailles, dans lesquelles est inclus du collagène natif fortement réticulé.

Conformément au procédé de l'invention, les nouveaux produits biologiques de remplacement du tissu conjonctif sont obtenus par incorporation d'un gel de collagène natif dans une structure spongieuse à base de collagène, associée le cas échéant à des glycosaminoglycanes, puis réticulation du collagène soluble à l'intérieur de la structure spongieuse.

L'incorporation peut s'effectuer par exemple par aspiration sous vide d'un gel de collagène soluble dans l'éponge de collagène faiblement réticulé. La réticulation du collagène soluble dans la structure spongieuse peut ensuite être réalisée simplement en portant l'ensemble à une température voisine de 37°C en maintenant le milieu à un pH sensiblement neutre.

Il est avantageux d'effectuer l'aspiration sous vide sous une pression inférieure à 2 bars (2.10^5 Pa) environ, par exemple entre 0,5 et 1 bar, et de préférence entre 0,6 et 0,8 bar. le rapport en poids du collagène soluble natif au collagène spongieux (faiblement réticulé) est fonction du degré d'hydratation du collagène, et peut être par exemple entre 1/2 et 1/10.

Le gel de collagène soluble utilisé dans l'invention peut être par exemple un gel de collagène acidosoluble natif de type I, associé le cas échéant à un autre type de collagène, et pouvant contenir des fibroblastes, des chondrocytes, des cellules inflammatoires, ou des cellules endothéliales.

Le collagène constituant la structure spongieuse est un collagène insoluble réticulé ou un collagène soluble précipité puis réticulé. La réticulation peut s'effectuer par les techniques connues susceptibles de lui donner une structure spongieuse, et plus particulièrement par traitement par le glutaraldéhyde, par lyophilisation ou par réticulation déhydrothermique. Ce collagène peut être associé à un ou plusieurs glycosaminoglycanes tels que, par exemple, l'acide chondroïtine-4-sulfate, l'acide chondroïtine-6-sulfate, l'acide hyaluronique, le keratane sulfate ou le dermatane sulfate, qui se fixent au collagène lors de la réticulation.

Les produits biologiques à base de collagènes ainsi obtenus possèdent des propriétés mécaniques bien supérieures à

celles des produits connus et à celles des matériaux de base pris isolément (collagène faiblement réticulé associé à des glycosaminoglycans d'une part, et collagène soluble réticulé de type I d'autre part). Ils peuvent être épithérialisés in vitro. Ils possèdent des propriétés qui peuvent avantageusement évoluer dans le temps, après la greffe, grâce à la dégradation plus rapide du collagène soluble natif, et sont ainsi d'abord hémostatiques, puis deviennent anticoagulants. Ils favorisent l'angiogénèse en raison notamment de la présence des glycosaminoglycans dans la trame spongieuse, et ont un effet d'attraction des fibroblastes, permettant la mise en place rapide d'un tissu néoconjonctif.

En raison des propriétés indiquées ci-dessus, les nouveaux produits biologiques de l'invention peuvent être directement utilisés tels quels pour des greffes, ou être conservés dans des conditions appropriées, de préférence sous vide à basse température, ou lyophilisés. Ils peuvent également être utilisés comme supports de culture de cellules épidermiques.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

EXEMPLE 1

On prépare un équivalent de tissu conjonctif prêt à être épithérialisé pour une greffe de peau ou de muqueuse suivant le procédé décrit ci-après.

On utilise comme collagène soluble natif un collagène acidosoluble extrait de derme de veau, dans une solution aqueuse d'acide acétique 0,5 M. La concentration en collagène est de 0,5% (m/v). On prépare un gel de collagène en effectuant d'abord une dialyse de la solution à 0,5% de collagène dans l'acide acétique 0,5 M contre de l'acide acétique à 1 p 1000 (v/v) pendant plusieurs jours, puis en neutralisant l'acide par 0,25 ml de soude 0,1 N pour 1,5 ml de collagène.

La trame spongieuse à larges mailles de collagène est constituée par une éponge de collagène associée à des glycosaminoglycans (acide condroïtine-4-sulfate), disponible dans le commerce sous la marque Translagen (Bioetica). Le rapport en

poids collagène/glycosaminoglycane est égal à environ 2/1 et la dimension des pores est d'environ 50 à 100 microns.

Le gel de collagène obtenu comme indiqué ci-dessus est aspiré sous vide dans la trame spongieuse en plaçant cette dernière sur un filtre à pores de 0,45 m posé sur un support-filtre pour analyses (Millipore) de 40 mm de diamètre, portant un réservoir de mêmes dimensions, dans lequel on coule le gel de collagène. La sortie du filtre est branchée à un appareil d'aspiration sous vide créant une dépression d'environ 0,7 bar ($0,7 \cdot 10^5$ Pa). L'aspiration sous vide provoque la descente du gel dans la trame jusqu'à ce que le filtre soit colmaté par le collagène, ce qui indique que l'éponge est totalement remplie par le gel, ce qui correspond à l'incorporation d'environ 5 ml de collagène soluble natif dans environ 6 ml d'éponge.

L'opération ci-dessus s'effectue à une température d'environ 4°C pour éviter une réticulation prématuée du gel.

L'éponge contenant le gel de collagène est ensuite portée à 37°C environ pendant 4 à 5 minutes environ, pour provoquer la réticulation du gel dans la trame spongieuse.

On obtient ainsi un produit à structure composite que l'on place dans une boîte de culture et que l'on recouvre du milieu de culture. Elle est ensuiteensemencée par des cellules épithéliales. Le milieu de culture est celui qui sera utilisé pour la culture de cellules épithéliales.

EXAMPLE 2

On prépare un équivalent dermique vivant en suivant le procédé indiqué ci-après.

On incorpore des fibroblastes dans le gel de collagène soluble décrit dans l'exemple 1, en opérant à 4°C selon la méthode de Bell. Les fibroblastes utilisés sont des fibroblastes de peau humaine subcultivés.

La composition du gel est la suivante (pour 10 ml de gel) :

MEM 1,76 X	4,6 ml
------------	--------

Collagène 0,5%	3,0 ml
----------------	--------

NaOH 0,1N	0,5 ml
-----------	--------

SVF	0,9 ml
-----	--------

5 Fibroblastes dans milieu de culture EMEM 1,0 ml

EMEM 1,76 X est un milieu de culture EMEM concentré (il peut s'agir de D-EMEM ou de L-EMEM complémentés à 10% de SVF); le milieu de culture EMEM est bien connu dans la technique. Le collagène est sous forme de solution aqueuse à 0,5% acidifiée par de l'acide acétique à 1 p 1000; SVF est du sérum de veau foetal.

Le gel est incorporé dans l'éponge de collagène suivant la même technique que dans l'exemple 1.

15 La structure composite ainsi obtenue peut être greffée telle quelle, ou être épidermisée in vitro pour reconstituer un équivalent de peau vivant.

REVENDICATIONS

1. Nouveau produit biologique de remplacement du tissu conjonctif, à structure composite à base de collagène, caractérisé en ce qu'il comprend une trame spongieuse à larges mailles de collagène soluble ou insoluble faiblement réticulé, dans lesquelles est inclus du collagène natif fortement réticulé.
- 10 2. Nouveau produit biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce que le collagène natif est constitué par un gel de collagène acidosoluble natif de type I fortement réticulé.
- 15 3. Nouveau produit biologique selon la revendication 2, caractérisé en ce que le collagène acidosoluble est associé à un autre type de collagène et/ou contient des fibroblastes, des chondrocytes, des cellules inflammatoires ou des cellules endothéliales.
- 20 4. Nouveau produit biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce que le collagène constituant la trame spongieuse est associé à un ou plusieurs glycosaminoglycanes.
- 25 5. Nouveau produit biologique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le glycosaminoglycane est choisi parmi l'acide chondroïtine-4-sulfate, l'acide chondroïtine-6-sulfate, l'acide hyaluronique, le keratane sulfate et le dermatane sulfate.
- 30 6. Procédé de préparation de nouveaux produits biologiques de remplacement du tissu conjonctif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on incorpore un gel de collagène natif dans une structure spongieuse à base de collagène associée le cas échéant à des glycosaminoglycanes, puis on effectue une réticulation du collagène natif à l'intérieur de la structure spongieuse.
- 35 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce l'incorporation s'effectue par aspiration sous vide d'un gel de collagène natif dans l'éponge de collagène faiblement réticulé.
8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la réticulation du collagène natif dans la structure spon-

gieuse est réalisée en portant l'ensemble à une température voisine de 37°C en maintenant le milieu à un pH sensiblement neutre.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2657352

N° d'enregistrement
nationalINSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9000870
FA 439223

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	DE-A-2 348 685 (NIHON HIKAKU) * Revendications * ---	1-8
Y	GR-A-2 612 939 (C.I.R.D.) * Abrégé * ---	1-8
Y	EP-A-0 083 868 (COLLAGEN CORP.) * Revendications * ---	1-8
A	EP-A-0 187 014 (COLLAGEN CORP.) -----	
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)		
A 61 L C 08 L		
Date d'achèvement de la recherche 04-10-1990		Examinateur LENSEN H.W.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		